

Vplyv rastových faktorov na produkciu celuláz vláknitou hubou *Trichoderma viride*

BOHUMIL ŠKÁRKA – HELENA BARÁTHOVÁ – VALTER VOLLEK –
JAROSLAV ZEMANOVIČ

Súhrn. Prídavok melasy ($2,5 \text{ g.l}^{-1}$) alebo zahusteného kukuričného výluhu ($2,5 \text{ g.l}^{-1}$) pozitívne ovplyvňuje produkciu celuláz vláknitou hubou *Trichoderma viride*. V porovnaní s kontrolou sa produkcia celuláz zvýši o 30–60 %. Prídavok fermentovaných pšeničných otrúb ($2,5 \text{ g.l}^{-1}$) pôsobí inhibične. Stimulačný efekt rastových faktorov sa dá ešte zvýšiť kombináciou s niektorými tenzidmi. Prídavok tenzidu Tween 80 (2 g.l^{-1}), Slovanik PV 37OB alebo NT 70 ($1-2 \text{ g.l}^{-1}$) vedie k zvýšeniu produkcie celuláz až o 150 %, ktoré však nie je v priamom vzťahu k produkcii extracelulárnych proteínov.

Viacerí autori [1, 2] sa zaoberali hľadaním závislostí medzi zložkami média a produkciou celuláz vláknitou hubou *Trichoderma viride*; vychádzali pritom z poznatkov o výživových nárokoch jednotlivých kmeňov *Trichoderma viride*. Mnohí autori sa venovali vplyvu induktorov [3–7], zdroja dusíka [8], pH [9, 10] alebo prídavkov tenzidov [11–13].

V tejto práci sledujeme vplyv rastových faktorov z melasy, zahusteného kukuričného výluhu (CSL) a fermentovaných pšeničných otrúb (FEO) na produkciu celuláz *Trichoderma viride* QM 9414 samostatne a v kombinácii s vybranými tenzidmi.

Materiál a metódy

Použitý mikroorganizmus. Používali sme kmeň *Trichoderma viride* QM 9414 zo zbierky Chemického ústavu SAV v Bratislave.

Kultivačné pôdy. Na kultiváciu *Trichoderma viride* sme používali pôdu podľa Mandelsovej a Webera [14], modifikovanú Farkašom a kol. [15] (tab. 1).

Doc. Ing. Bohumil Škárka, DrSc., Ing. Helena Baráthová, RNDr. Valter Vollek, Ing. Jaroslav Zemanovič, CSc., Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

T a b u l k a 1. Porovnanie kultivačných pôd podľa Mandelsovej a Webera [14] a Farkaša a kol. [15]

T a b l e 1. The comparison of substrates according to Mandels and Weber [14] and Farkaš et al. [15]

Látka ¹	Mandelsová a Weber [g]	Farkaš a kol. [g]
močovina ²	0,3	0,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	1,4
KH ₂ PO ₄	2,0	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	0,3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,3	0,3
celulóza ³	10,0	10,0
kvasničný extrakt ⁴	0,1	0,1
pepton ⁵	–	1,0
Tween 80	–	2,0
vodovodná voda ⁶	1,0 l	1,0 l

¹Substrate; ²Urea; ³Cellulose; ⁴Yeast extract; ⁵Peptone; ⁶Tap water.

Do pôdy sme podľa podmienok pokusov pridávali melasu, zahustený kukuričný výluh alebo fermentované pšeničné otruby [16].

Podmienky kultivácie. Používali sme 500 ml banky so 125 ml pôdy pH 5,0. Kultivovali sme na rotačnej trepačke (5 cm excenter, 110 obr. min⁻¹) pri 28 °C.

Stanovenie celulázovej aktivity na filtračný papier (FPA). 0,2 ml odstredeného kultivačného média sme v skúmavke zriedili 0,3 ml vody, pridali 0,5 ml 0,05 mol.dm⁻³ citrátového tlmivého roztoku, pH 4,8 a prúžok 6 x 1 cm filtračného papiera Whatman 1. Skúmavku sme vložili do vodného kúpeľa (50 °C) a nechali inkubovať 60 min. Po ochladení roztoku sme v ňom stanovili redukujúce sacharidy [17] alebo glukózu [18].

Stanovenie proteínov. Proteíny sme stanovili metódou podľa Lowryho [19, 20].

Výsledky a diskusia

Zahustený kukuričný výluh (CSL) a fermentované pšeničné otruby (pre ktoré bol vypracovaný postup prípravy) sa v kultivačných médiách často používajú ako zdroj rastových látok [16]. Pre pomerne vysoký obsah mikroelementov a niektorých organických dusíkatých látok sa vo viacerých našich pokusoch melasa osvedčila ako stimulátor.

T a b u ľ k a 2. Vplyv testovaných zdrojov rastových faktorov a ich kombinácie s tenzidmi na produkciu celulózu (ako FPA) vláknitou hubou *Trichoderma viride* QM 9414

T a b l e 2. Influence of tested growth factors and their combinations with tensides on cellulase production (expressed as FPA) using the fibrous fungus *Trichoderma viride* QM 9114

Pridaná látka ¹	Koncentrácia ² [g.l ⁻¹]	Deň dosiahnutia maxima FPA ³	Maximum FPA ⁴ [nkat.ml ⁻¹]	% k maximu kontroly ⁵
Kontrola ⁶	—	7	5,44	100
melasa ⁷	2,5	7	9,09	167
CSL	2,5	10	8,02	142
FEO	2,5	10	4,27	79
Tween 80	2	6—10	9,5—11	167—203
Slovanik NT 70	1	6—10	8,4— 9,5	148—175
Slovanik PV 37OB	1	7—10	8,8—10,5	157—192
melasa ⁷	2,5			
+ Tween 80	2	10	14,41	265
melasa ⁷	2,5			
+ Slovanik NT 70	1	7	11,99	221
melasa ⁷	2,5			
+ Slovanik PV 37OB	1	7	12,41	228
CSL + Tween 80	2,5+2	6	14,63	258
CSL + Slovanik NT 70	2,5+1	7	14,34	253
CSL + Slovanik PV 37OB	2,5+1	6	12,66	224
FEO + Tween 80	2,5+2	10	10,12	187
FEO + Slovanik NT 70	2,5+1	10	5,98	110
FEO + Slovanik PV 37OB	2,5+1	7	5,65	104

¹Addition; ²Concentration; ³Day of achieving maximal FPA value; ⁴Maximal FPA value; ⁵Percentage to maximum of control; ⁶Molasses.

Prídavok týchto rastových faktorov do kultivačného média sme kombinovali aj s prídavkom tenzidov, ktoré vykázali pozoruhodný stimulačný účinok na produkciu celulózu *Trichoderma viride* [11–13, 21]. Výsledky pokusov uvádza tabuľka 2. Všetky výsledky (i ďalej) sú priemerom 3 až 5 paraleliiek.

Z tabuľky 2 vidieť, že prídavok melasy zvyšuje produkciu celulózu oproti kontrole až o 60 %, zahustený kukuričný výluh o 40 %, kým fermentované pšeničné otruby majú inhibičný účinok (-21 %).

Kombinácia rastových faktorov s tenzidmi spôsobuje výrazné zvýšenie produkcie celulózu. Najvyššie hodnoty sme dosiahli s melasou a tenzidom Tween 80. Len o niečo nižšie hodnoty boli pri prídavku zahusteného kukuričného výluhu v kombinácii s tenzidom Tween 80. Pri použití tenzidov typu Slovanik boli hodnoty blízke výsledkom pri použití tenzidu Tween 80.

V ďalšej sérii pokusov sme sledovali závislosť zvýšenia produkcie celulózu pod vplyvom rastových faktorov a tenzidov od produkcie extracelulárnych

proteínov (tab. 3). Z výsledkov možno dedukovať, že medzi tvorbou celuláz *Trichoderma viride* a tvorbou extracelulárnych proteínov nie je priama závislosť [21].

T a b u l k a 3. Vplyv rastových faktorov z melasy a tensidov Tween 80 a Slovanik PV 37OB na produkciu celuláz a extracelulárnych proteínov *Trichoderma viride* QM 9114

T a b l e 3. Influence of growth factors from molasses and tensides Tween 80 and Slovanik PV 37OB on the both cellulase production and extracellular proteins *Trichoderma viride* QM 9114 production

Pridaná látka ¹	Koncen- trácia ² [g.l ⁻¹]	Čas kultivácie [dni] ³				% k max. kontroly ⁴
		3	5	7	10	
Produkcia celuláz (vyjadrená ako FPA⁵ [nkat.ml⁻¹])						
kontrola ⁷	–	2,57	4,65	5,49	2,89	100
Tween 80	2	3,60	10,15	6,86	3,71	186
Slovanik PV 37OB	1	4,03	8,44	5,64	2,98	153
	2	4,20	9,72	6,49	3,09	177
melasa ⁸	2,5	6,00	6,54	7,48	6,43	136
melasa ⁸ + Sl.PV 37OB	2,5+1	7,38	13,30	8,27	4,45	242
melasa ⁸ + Tween 80	2,5+1	7,20	11,81	11,11	10,15	215
Produkcia extracelulárnych proteínov⁶ [mg.ml⁻¹])						
kontrola ⁷	–	0,92	1,14	1,43	1,88	100
Tween 80	2	1,40	2,39	2,76	2,45	147
Slovanik PV 37OB	1	1,20	1,83	2,05	1,94	109
	2	1,23	2,11	2,39	2,05	127
melasa ⁸	2,5	1,63	2,07	2,20	2,17	136
melasa ⁸ + Sl.PV 37OB	2,5+1	1,83	2,62	2,82	2,91	155
melasa ⁸ + Tween 80	2,5+1	198	3,17	2,78	3,05	168

¹Addition; ²concentration; ³Cultivation time days; ⁴Percentage to maximum of control; ⁵Cellulase production (expressed as FPA); ⁶Molasses; ⁷Production of extracellular proteins.

Literatúra

- [1] GUPTA, J. K. – DAS, N. B. – GUPTA, Y. P., Agric. Biol. Chem., 36, 1972, č. 11, s. 1961.
- [2] STERNBERG, D., Biotechnol. Bioeng., 18, 1976, č. 12, s. 1751.
- [3] NISIZAWA, T. – SUZUKI, H. – NISIZAWA, K., J. Biochem., 71, 1972, 999.
- [4] MARKKANEN, P. H. – BAILEY, M. J., Proc. 5th Int. Ferment. Symp., Berlín 1975, s. 24, 14.
- [5] MANDELS, M., Biotechnol. Bioeng. Symp., 5, 1975, s. 81.
- [6] OSTRIKOVA, N. A. – KONOVALOV, S. S., Prikl. Biochim. Mikrobiol., 17, 1981, č. 6, s. 854.
- [7] MOROZOVA, E. S. – ORANSKAJA, M. S. – LOGUNOV, A. I.: In: Celljulyazy mikroorganizmov, Moskva, Nauka 1981, s. 142.
- [8] GOTTWALDOVÁ, M. – KUČERA, J. – PODRAZKÝ, V., Biotech. Lett., 4, 1982, s. 229.

- [9] MUKHOPADHYAY, S. N.: Proc. 2nd Eur. Congr. on Biotechnology, Eastbourne, 1981, s. 283.
- [10] BROWN, D. E. – HALSTED, D. J., Biotechnol. Bioeng., 17, 1975, č. 8, s. 1199.
- [11] Pat. Jap., 150 383, 1957.
- [12] REESE, E. T. – MAGUIRE, A., Dev. Ind. Microbiol., 12, 1970, s. 212.
- [13] GRIFFIN, H. L. – SLONEKER, J. H. – INGLET, E. E., Appl. Microbiol., 27, 1974, č. 6, s. 1061.
- [14] MANDELS, M. – WEBER, J., Adv. Chem. Ser., 95, 1969, s. 391.
- [15] FARKAŠ, V. – KOLAROVA, N. – LABUDOVÁ, I. – BAUER, Š., Proc. 3rd Symp. Socialist Countries on Biotechnology, Bratislava, 1983, s. 1.
- [16] VOLLEK, V., Mikrobiologické praktikum. Bratislava, ES SVŠT 1983, s. 72.
- [17] MILLER, G. L. – BLUM, R. – GLENNON, W. E. – BURTON, A. L., Anal. Biochem., 1, 1960, s. 127.
- [18] BIO-LA-TEST, Stanovenie glukózy. Lachema Brno.
- [19] PEITERSEN, N., Biotechnol. Bioeng., 19, 1977, č. 3, s. 337.
- [20] DABÍDEK, J. – HRDLÍČKA, J. – KARVÁNEK, M. – POKORNÝ, J. – SEIFERT, J. – VELÍŠEK, J., Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha, SNTL 1977, 267 s.
- [21] ŠKÁRKA, B. – ZEMANOVIČ, J., Vplyv tenzidov na produkciu celulózy vláknitou hubou *Trichoderma viride*. Bull. PV, 26 (6), 1987, č. 3.

Влияние факторов роста на продукцию целлюлаз грибом *Trichoderma viride*

Резюме

Добавка мелассы ($2,5 \text{ г.л}^{-1}$) или сгущенного кукурузного экстракта ($2,5 \text{ г.л}^{-1}$) положительно влияет на продукцию целлюлаз грибом *Trichoderma viride*. По сравнению с контролем продукция целлюлаз повышается на 30–60 %. Добавка бродильных пшеничных отрубей ($2,5 \text{ г.л}^{-1}$) вызывает ингибирование. Стимулирующий эффект факторов роста можно ещё повысить комбинацией с некоторыми тензидами. Добавка тензида Tween 80 ($2,0 \text{ г.л}^{-1}$), Slovanik PV 370V или NT 70 ($1-2 \text{ г.л}^{-1}$) вызывает повышение продукции целлюлаз на 150 %. Это повышение продукции целлюлаз не имеет прямого отношения к продукции внеклеточных протеинов.

Influence of growth factors on the cellulase production using fibrous fungus *Trichoderma viride*

Summary

The addition of molasses (2.5 g l^{-1}) or corn-steep liquor (2.5 g l^{-1}) has the positive effects on cellulase production using fibrous fungus *Trichoderma viride*. The cellulase production increased by 30–60 % compared with control sample. The addition of fermented corn bran (2.5 g l^{-1}) has inhibitory effect. Stimulation effect of growth factors can be increased by adding some tensides. The addition of Tween 80 (2 g l^{-1}), Slovanik PV 370B or NT 70 ($1-2 \text{ g l}^{-1}$) tensides increases the cellulase production by as many as 150 %. This increase of cellulase production is not in direct relation to the production of extracellular proteins.